

Der Einfluß von encephalitogenem Peptid
und basischem Markscheidenprotein
auf die Thrombozytenaggregation
bei Multiple-Sklerose-Kranken
und Patienten mit anderen
neurologischen Erkrankungen

Werner Bachmann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554818_0114

Aus der Neurologischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Schrader

Der Einfluß von encephalitogenem Peptid und basischem
Markscheidenprotein auf die Thrombozytenaggregation
bei Multiple-Sklerose-Kranken und Patienten mit
anderen neurologischen Erkrankungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Werner Bachmann
aus Born
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schrader

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Brandt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 01. 1987

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturüberblick	
2.1. Basisches Markscheidenprotein und encephalitogenes Peptid bei experi- mentell-allergischer Encephalomyeli- tis und Multipler Sklerose.....	3
2.2. Forschungslinien bei Multipler Sklerose.....	8
2.3. Die Thrombozytenfunktion bei MS.....	11
3. Eigene Untersuchungen	
3.1. Material und Methodik	
3.1.1. Geräte.....	14
3.1.2. Reagenzien.....	14
3.1.3. Versuchsanordnung.....	15
3.1.3.1. Blutentnahme.....	16
3.1.3.2. Inkubation und Zentrifugation.....	16
3.1.3.3. Aggregationsmessung.....	17
3.2. Versuche	
3.2.1. Plättchenreiches Plasma und Serum....	17
3.2.2. Plättchenreiches Plasma und Mark- scheidenprotein.....	18
3.2.3. Plättchenreiches Plasma und EP.....	18
3.2.4. Plättchenreiches Plasma von gesunden Kontrollpersonen und Serum-EP von MS-Patienten.....	19
3.3. MS-Patienten und Kontrollpersonen	
3.3.1. MS-Patienten.....	21
3.3.2. Kontrollpatienten.....	21
3.3.3. Ausschlußkriterien.....	22
4. Ergebnisse.....	24

5. Diskussion.....	37
6. Zusammenfassung.....	43
7. Literaturverzeichnis.....	44

Nachwort

Lebenslauf

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Entmarkungskrankheit der weißen Hirnsubstanz. Sie wurde 1839 von CRUVEILHIER erstmals beschrieben (12). Obwohl seit dieser Zeit intensiv geforscht wird, sind sowohl Ätiologie als auch Pathogenese der MS nach wie vor unklar.

Die Krankheit stellt eines der häufigsten organischen Nervenleiden dar; 3 bis 7 Menschen von 10.000 sind in Mitteleuropa von der Krankheit betroffen (32). Die geographische Verbreitung der MS ist ausgesprochen unterschiedlich. Während in den USA ebenso wie in Mittel- und Nordeuropa die Krankheit häufig auftritt, ist sie in anderen Gegenden wie z.B. Südamerika oder Asien so gut wie unbekannt.

In der Behandlung macht zunächst die sichere Diagnose Schwierigkeiten. Kein einziges neurologisches Zeichen gilt als krankheitsbeweisend, ebensowenig ein Laborbefund. Die Diagnose "MS" ist oft eine Ausschlussdiagnose. Der Krankheitsverlauf ist schwer vorherzusagen. Die ganze Bandbreite reicht von der fulminanten Erkrankung, die in wenigen Jahren zum Tode führt, bis zur langsam fortschreitenden Form, die vielleicht nach langen Jahren "ausgebrannt" zum Stillstand kommt. Bei der Mehrzahl der Patienten hat die Krankheit einen langen Verlauf, die mittlere Krankheitsdauer liegt bei etwa 25 Jahren.

Pathologisch-anatomisch fallen die disseminierten Entmarkungsherde in der weißen Substanz auf. Sie können in jeder ZNS-Region auftreten, es gibt jedoch bevorzugte Gebiete (vgl. Kap. 2.1). Die Plaques haben ganz unterschiedliche Größe von Millimetern bis zu

einigen Zentimetern. Oft liegen Entmarkungsherde um kleine Venolen herum, in denen von einigen Autoren thrombotische Verschlüsse beschrieben wurden.

PUTNAM wies 1937 als erster darauf hin, daß in diesen Thromben Thrombozyten enthalten sind (31).

Damit waren auch die Blutplättchen Untersuchungsgegenstand auf dem Weg zur Erhellung der Pathogenese der MS. Nach vielen Untersuchungen der Thrombozytenadhäsion, der Haftneigung an fremden Oberflächenstrukturen, wurde in jüngster Zeit die Thrombozytenaggregation gemessen, also die Eigenschaft der Plättchen miteinander zu verkleben. Daß es bei der Multiplen Sklerose Änderungen der Thrombozyteneigenschaften gibt, ist bekannt (3,4,9,17,41).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Aggregationsneigung der Blutplättchen von MS-Patienten mit der von neurologischen Kontrollpatienten verglichen. Dabei wurden die Thrombozyten dem Einfluß von basischem Markscheidenprotein und encephalitogenem Peptid ausgesetzt. Die zugrundeliegende Fragestellung war, ob diese Substanzen in spezifischer Weise bei MS-Kranken die Aggregationsneigung der Thrombozyten verändern und wenn ja in welcher Weise.

2. LITERATURÜBERBLICK

2.1. Basisches Markscheidenprotein und encephalito- genes Peptid bei experimentell-allergischer Encephalomyelitis und Multipler Sklerose

Ab dem 4. Embryonalmonat setzt die Myelogenese ein, die Markscheidenbildung oder auch Markreifung. Zunächst beginnen im peripheren Nervensystem die Schwannschen Zellen mit der Umwicklung der entsprechenden Nerven; die Myelogenese im Zentralnervensystem (ZNS) durch die Oligodendroglia setzt etwas später ein. Die Markscheide besteht aus wechselnden Schichten von Protein und Lipid. Ein wichtiges Protein stellt dabei das sogenannte basische Markscheidenprotein (MBP) dar. Das Interesse an der Struktur des MBP ist eng verknüpft mit der Entwicklung von Vorstellungen von Immun- und Autoimmunkrankheiten (3). KABAT et al. (1947) zeigten den Autoimmuncharakter der experimentell-allergischen Encephalomyelitis (EAE). Dabei wurde Affen ein autologes Homogenat von ZNS-Gewebe in Freundschem Adjuvans injiziert. Nach zwei bis drei Wochen entwickelten sie alle Zeichen einer disseminierten Encephalomyelitis. Wichtig für das Verständnis der Immunvorgänge war die Kenntnis des encephalitogenen Agens. Es stellte sich heraus, daß das basische Protein im Myelin des Nervengewebes (MBP) den stärksten encephalitogenen Charakter trägt. Es ist ein Protein aus 170 Aminosäuren (vgl. Abb. 1). Auffällig ist der hohe Gehalt der basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin, die etwa 25 % der Aminosäuren stellen. Die Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigen-

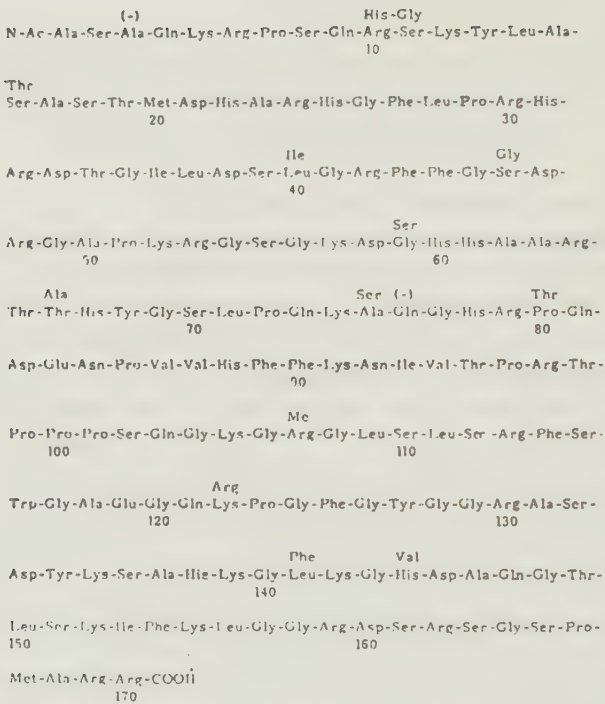


Abb. 1: Die Aminosäuresequenz von basischem Mark-
scheidenprotein vom Rind und vom Menschen
(aus 23)

schaften ergaben, daß die krankheitserzeugende Eigenschaft nicht durch Erhitzen oder Behandlung mit Harnstoff beeinträchtigt wird. Sekundär- und Tertiärstruktur sind wesentlich weniger wichtig als die

Primärstruktur (23). Die Primärstruktur wurde unterteilt und einzelne Teilpeptide chromatographisch gewonnen. Das, was im folgenden als encephalitogenes Peptid (EP) bezeichnet wird, stammt aus Rindermyelin und besteht aus neun Aminosäuren (vgl. Abb. 2). Es stellt die Aminosäuren 114 bis 122 des MBP dar und ist das krankheitsinduzierende Agens bei Meerschweinchen.

Bovine sequence:	H-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys-OH
Human sequence:	H-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Arg-OH

Abb. 2: Die Aminosäuresequenz von encephalitogenem Peptid (aus 23)

Diese sind die gebräuchlichsten Versuchstiere zur Untersuchung der EAE. Die Aminosäuresequenz des EP kann nicht verändert werden, ohne daß die Fähigkeit zur Krankheitsinduktion verloren geht. Auch der Ersatz einzelner Aminosäuren ist nicht möglich (23).

Die EAE wird weithin als Labormodellkrankheit für die Multiple Sklerose angesehen. Von der Ätiologie her sind die Krankheiten nicht vergleichbar, denn bei der EAE wird bei gesunden Versuchstieren artifiziell ein starker Reiz gesetzt - basisches Markscheidenprotein in Freundschem Adjuvans wird subcutan injiziert -, dagegen ist über die Ätiologie der MS sehr wenig bekannt (s. 2.2.). Trotzdem ist die EAE hilfreich bei der Beobachtung einer neurologischen Entmarkungskrank-

heit, die - wie MS - akut und in Schüben sowie chronisch progredient verlaufen kann (36).

Die Entmarkungsherde sind bei EAE und MS genau untersucht. Bei beiden gibt es Plaques sehr unterschiedlicher Größe mit Prädilektionsstellen im ZNS. Bei der Multiplen Sklerose sind das u.a. Sehnerven, Pons mit Augenmuskelkernen, Hirnstamm, Kleinhirn, Pyramidenbahnen, Hinterstränge des Rückenmarks sowie Gebiete um die Ventrikel. Auch ist sehr häufig das demyelinisierte Axon im Plaque intakt, so daß ein Axon, das einen Entmarkungsherd durchzieht, nur an der Stelle des Plaques die Myelinscheide verloren hat und damit die Fähigkeit zur Erregungsfortleitung.

Bei der EAE gibt es einige ähnliche neurologische Ausfälle wie bei MS mit Inkontinenz, Para- und manchmal Tetraparesen bei den Versuchstieren. Bei beiden Krankheiten ist es oft schwierig, neurologische Ausfälle pathologisch nachgewiesenen Entmarkungsherden zuzuordnen (1, 3). ADAMS schreibt, daß ein Herd im Sehnerv gut einem Abschnitt in der Krankheitsgeschichte mit Retrobulbärneuritis zugeordnet werden kann; auf der anderen Seite gibt es oft bei akuten MS-Fällen keine deutlich abgegrenzten Entmarkungsherde, sondern eher kleine, diffuse, mit bloßem Auge nicht sichtbare Markverletzungen oder sehr kleine zusammenfließende Herde, die einen gesprenkelten, bröckeligen Eindruck der Marksubstanz vermitteln. Die klinische Symptomatik ist meistens milder, als es der pathologische Befund erwarten läßt (1, 3). BERNARD et al. beschreiben, daß es bei Versuchstieren mit EAE häufig eine Diskrepanz zwischen konstanten motorischen Ausfällen und dem sehr variablen Sitz der Entmarkungsherde gibt. Bei Nagern

sind beispielsweise die Hinterbeine häufig gelähmt, die Vorderbeine dagegen sehr selten, ohne daß es dafür Belege in den entsprechenden Hirnarealen gibt.

Das basische Markscheidenprotein löst im Versuchstier auch eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ aus als klassisches Beispiel einer zellvermittelten Immunantwort. Interessant ist, daß die Änderung von einzelnen Aminosäuren in der Peptidkette, so auch der Austausch des einzigen im MBP vorkommenden Tryptophan, zwar die Fähigkeit wegnimmt, eine EAE im Versuchstier auszulösen, nicht aber die Fähigkeit zur zellvermittelten Immunreaktion. Träger dieser Immunreaktion sind die T-Lymphozyten, deren Eigenschaften bei MS-Patienten u.a. von FRICK und STICKL (16, 17) untersucht wurden.

Um die Entwicklung einer EAE zu unterdrücken, gibt es neben immunsuppressiven und entzündungshemmenden Maßnahmen auch den Weg über spezifisch immunologische Methoden (3). Wenn MBP in hoher Dosis vor Auslösung der EAE oder in der Latenzphase vor den ersten neurologischen Symptomen injiziert wird, ist das Versuchstier vollständig geschützt. Dabei muß die MBP-Dosis sehr viel höher als bei der EAE-Induktion sein. Zum ersten Mal gelang das FERRARO und CAZZULLO 1949 bei Meerschweinchen. Auch wenn die Fähigkeit zur EAE-Auslösung durch Veränderung des Tryptophans wie oben beschrieben genommen ist, kann es dennoch in hohen Dosen EAE verhindern; die encephalitogene Determinante ist - zumindest teilweise - nicht notwendig, um die EAE zu hemmen. In jüngster Zeit wurden Hemmversuche mit MBP auch bei MS-Kranken gemacht. ROMINE und SALK (38) verwendeten Dosierungen, die umgerechnet bei Versuchstieren eine EAE sicher hemmen. Es gelang nicht, ein-

deutige Besserungen zu erreichen; dieses Ergebnis zeigt deutlich die Grenzen der EAE als Modellkrankheit.

2.2. Forschungslinien bei Multipler Sklerose

Die Multiple Sklerose trägt einige rätselhafte Züge. Die Diagnose orientiert sich heute an den Kriterien von SCHUMACHER und ROSE (20, 39), die in Tab. 1 aufgeführt sind. Für viele Beobachtungen im Zusammenhang mit Auftreten, Verbreitung und betroffenem Personenkreis gibt es keine plausiblen Erklärungen. Schon erwähnt wurde die Beschränkung auf einige geographische Gebiete. Es gibt die epidemiologische Feststellung, daß Personen, die vor ihrem 15. Lebensjahr aus risikoreichen Zonen in risikoarme Länder umsiedeln, von der Multiplen Sklerose verschont bleiben (40). Frauen erkranken ungleich häufiger als Männer. Sowurden ganz verschiedene Einflüsse für Entstehung und Entwicklung der Krankheit verantwortlich gemacht wie genetische Faktoren, Umweltbedingungen oder Ernährungsgewohnheiten.

Frühzeitig wurde diskutiert, ob ein Virus die Krankheit auslöst. Dafür würden einige Gründe sprechen, wie die vermutete lange Latenzzeit, das typische Krankheitsmuster mit Schüben und Remissionen und die auffällige geographische Verteilung (26). Andere neurologische Erkrankungen dienen als Beispiel einer sogenannten "slow virus"-Infektion, wie die "subakute sklerosierende Panencephalitis". Dabei erfolgt die Infektion mit einem masernähnlichen Paramyxovirus im Schulkindalter. Später beginnt die Krankheit mit ausgedehnten Markscheidendegenerationen.

Klinisch definitive Multiple Sklerose:

1. Die neurologische Untersuchung ergibt objektive Störungen der ZNS-Funktion
2. Anamnese und Untersuchung deuten auf mindestens zwei betroffene Gebiete im ZNS hin
3. Die Krankheit zeigt überwiegend Zeichen der weißen Substanz
4. a) Zwei oder mehr Schübe im Abstand von mindestens einem Monat sind zu trennen, jeder Schub dauert länger als 24 h oder
b) langsame, schrittweise Progredienz der Symptome über mehr als 6 Monate
5. Der Krankheitsbeginn liegt zwischen dem 10. und 50. Lebensjahr
6. Keine bessere neurologische Erklärung der Symptome ist möglich

Wahrscheinliche Multiple Sklerose:

1. Schubförmiger Krankheitsverlauf mit nur einer neurologischen Störung
2. Einmaliger Schub mit dokumentierten Zeichen multifokalen Befalls der weißen Substanz mit Remission
3. Keine bessere Erklärung möglich

Mögliche Multiple Sklerose:

1. Schubförmiger Krankheitsverlauf ohne dokumentierte Symptome oder
2. Objektivierete Symptome von einer ZNS-Region
3. Keine bessere Erklärung möglich

Tab. 1: Kriterien zur Diagnose "MS" nach SCHUMACHER und ROSE

Bei der MS wurde auch die Inkorporation von Influenza-viren im menschlichen Blutplättchen als Ursache von morphologischen Veränderungen von Lymphozyten und Thrombozyten untersucht (13). Die Vorstellung ist, daß das Virus bei Personen mit einer bestimmten genetischen Disposition auf eine defekte zelluläre Abwehr trifft. Bei MS-Kranken ist eine Fraktion der T-Lymphozyten, die sogenannten Suppressorzellen, zu Beginn eines Schubes deutlich vermindert. Im Stadium der Remission ist die Anzahl dieser Lymphozyten im peripheren Blut dagegen erhöht (26). Die Suppressorzellen regulieren u.a. die Produktion von Antikörpern.

Die Vorstellung von MS als Autoimmunkrankheit wurde am Beispiel der experimentell-allergischen Encephalomyelitis entwickelt (s.o.). Im Liquor cerebrospinalis und im Serum finden sich Antikörper gegen Myelin und gegen basisches Markscheidenprotein. FRICK und STICKL fanden Antikörper gegen MBP, die durch antikörperabhängige zytotoxische Reaktionen von Lymphozyten gegen spezielle Erythrozyten entdeckt wurden. Sie beobachteten auch, daß encephalitogenes Peptid Lymphozyten zu starken blastoiden Transformationen im Sinne einer antigenspezifischen Reaktion veranlaßt (16, 17). MS als Autoimmunkrankheit setzt voraus, daß durch einen Immundefekt die Markscheiden angegriffen werden und nicht etwa sekundär die Antikörper entstehen, nachdem Markscheidengewebe schon zerfallen ist.

Der Verdacht, daß Ernährungsgewohnheiten die Entstehung der MS begünstigen, wurde durch Untersuchungen gestützt, nach denen MS-Patienten einen Mangel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (u.a. Linolensäure) aufweisen (41, 43). Im Serum wie auch in Erythrozyten und Thrombozyten ist der Linolensäurespiegel gesenkt (19). Aller-

dings ist die Vorstellung wieder in den Hintergrund getreten, daß ein generalisierter Defekt im Stoffwechsel der essentiellen Fettsäuren vorliegt mit daraus folgender Vorschädigung der Membranen und des Myelins. Statt dessen herrscht die Meinung vor, daß in der Immunregulation durch Protaglandine, deren Vorstufen essentielle Fettsäuren darstellen, ein Fehler vorliegt. So führt die Gabe von Linolensäure bei Meerschweinchen zu einem deutlich mildereren Verlauf der EAE. Dieser Effekt ist aufhebbar durch die Gabe von Prostaglandinsynthesehemmern (41).

2.3. Die Thrombozytenfunktion bei MS

Alle bisher erwähnten Gesichtspunkte spielen bei der Untersuchung der Blutplättchen eine Rolle. Seitdem PUTNAM 1937 die vaskuläre Theorie der MS veröffentlichte, ließ das Interesse an den Blutplättchen nie ganz nach. Die These, daß thrombozytenreiche Hirnvenenthrombosen die Ursache der MS darstellen, stieß rasch auf Widerstand mit der Begründung, daß nichts bei der MS auf lokale Durchblutungsstörungen und damit auf infarktähnliche Areale hinweist. In einem Infarktgebiet ist das Axon viel gefährdeter als die Markscheide.

Die Blutplättchen zeigen Merkmale einer krankheitsspezifischen Veränderung. Die einfache Thrombozytenadhäsivität ist in aktiven Phasen der Multiplen Sklerose erhöht und kehrt in stationären Phasen der Krankheit zu normalen Werten zurück. CASPARY und FIELD zeigten, daß encephalitogenes Peptid bei MS-Kranken deutlich die Plättchenadhäsivität steigert; außerdem ist die

Serotoninfreisetzung aus den Thrombozyten erhöht. Sie äußerten die Vermutung, daß dies Reaktionen auf Antigen-Antikörperkomplexe darstellen könnte (9, 10). Die erhöhte Plättchenadhäsivität kann nach MILLAR et al. (28) auch das Ergebnis der Nervengewebsschädigung sein, da die im Gewebe enthaltenen Phospholipide die Thrombozyten reizen.

SRIVASTAVA et al. (42) beschrieben 1975, daß in den Thrombozyten MS-Kranker die Synthese der Prostaglandine PG E₁ und PG E₂ herabgesetzt ist. PG E₁ hemmt, PG E₂ fördert die Aggregation. Da der hemmende Effekt von PG E₁ den fördernden von PG E₂ um etwa das Zehnfache übertrifft, fällt bei gleichmäßiger Verminderung der fördernde Einfluß stärker ins Gewicht und es resultiert insgesamt eine erhöhte Aggregationsneigung. Es wurde diskutiert, daß diese Störung der Prostaglandinsynthese durch Viren hervorgerufen sein könnte. Andererseits könnte auch die diätetische Theorie eine Rolle spielen, da mehrfach ungesättigte Fettsäuren Ausgangsstoffe der Prostaglandine sind.

In jüngster Zeit wurde nach der Thrombozytenadhäsivität die Plättchenaggregation näher untersucht. Verschiedene Mechanismen wirken auf die Aggregation. ADP stimuliert den Formenwandel der Thrombozyten. Thromboxan wird im Blutplättchen unter Mitwirkung der Prostaglandine gebildet und ist eine stark aggregationsfördernde Substanz. Diesen Weg blockiert die Acetylsalicylsäure, indem sie die Cyclooxygenase hemmt, die bei der Bildung der Prostaglandine beteiligt ist.

Ferner wirkt auf die Aggregation ein sogenannter plättchenaktivierender Faktor PAF. Er wird unter anderem aus basophilen Leukozyten und Monozyten bei

Kontakt mit Thrombin, Kollagen und ADP freigesetzt. Nach Reaktion mit PAF setzen die Thrombozyten ihre vasoaktiven Amine frei. In verschiedenen Arbeiten (9, 10, 45) wurde gezeigt, daß bei MS-Patienten die Thrombozytenaggregation in Anwesenheit verschiedener Substanzen verändert ist. Arachidonsäure und Serotonin wirken stark aggregationsfördernd im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen, ebenso wie encephalitogenes Peptid. Ein Zusammenhang mit der Pathogenese der MS kann bislang höchstens vermutet werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Geräte

Photometer: EPPENDORF 1101 M mit Filter 546 nm
Aggregometer: Universal-Aggregometer der Fa. Braun-Melsungen zum EPPENDORF-Photometer
Schreiber: Omniscrite TM Recorder der Fa. Houston Instruments
Zentrifuge: Labofuge der Fa. Heraeus-Christ
Küvetten und Reagenzröhrchen aus silikonisiertem Plastikmaterial.

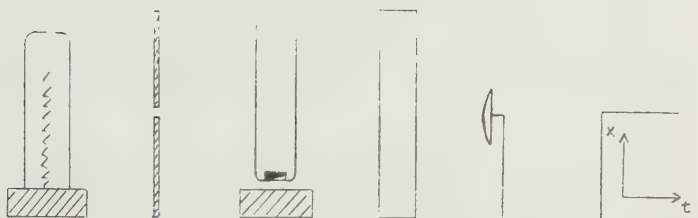
3.1.2. Reagenzien

- Adenosindiphosphat (Boehringer, Mannheim) M = 427,2
Herstellung einer Stammlösung von 0,05 millimolarem ADP in destilliertem Wasser; daraus bei Bedarf Herstellung einer Gebrauchslösung von 50 μ molar in destilliertem Wasser
- encephalitogenes Peptid (Interchem, München) M = 1070
Herstellung einer Gebrauchslösung von 1 mg/ml in steriler Kochsalzlösung
- basisches Markscheidenprotein (Lehrstuhl für Experimentelle Chirurgie der Universität München) M = 20.000
Herstellung einer Gebrauchslösung von 1 mg/ml in steriler Kochsalzlösung

Die Gebrauchslösungen von sämtlichen Reagenzien wurden bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

3.1.3. Versuchsdurchführung

Die Plättchenaggregation wurde nach BREDDIN in der Methode von BORN und O'BRIEN (PAT III; 5, 7, 8) gemessen in der folgenden Versuchsanordnung.



Lichtquelle Blende Küvette mit Filter Photozelle x/t-Schreiber
Rührmagnet 546 nm

Abb. 3: Versuchsanordnung

Dabei wird durch photometrische Messung die Abnahme der Trübung des Plasmas mit der Zunahme von Plättchenaggregaten korreliert; dieses Verfahren ist quantitativ gut reproduzierbar und gibt die zeitlichen Zusammenhänge gut wieder bei Aggregation sowohl ohne als auch mit induzierenden Substanzen.

Die Aggregation wird in relativen Einheiten gemessen, das plättchenreiche Plasma wird vor Versuchsbeginn jeweils auf eine Extinktion von etwa 0,9 geeicht. Eine wichtige Voraussetzung ist ein exakter Terminplan des Versuchs, da die Plättchen in vitro rasch altern und so zeitlich zunehmend zu Aggregatbildung neigen. Um den daraus resultierenden Fehler möglichst gering zu halten, wurden die einzelnen Versuchsschritte in einem engen zeitlichen Rahmen durchgeführt.

3.1.3.1. Blutentnahme

In einer 20 ml Kunststoffspritze befanden sich 2 ml 3,13 % Natriumcitrat von Umgebungstemperatur. Die Blutentnahme erfolgte mit einer weitlumigen Kanüle (Nr. 1, weiß) durch Punktion einer großen Vene. Dabei wurde die Beimengung von Gewebssaft möglichst vermieden. Das Blut wurde ohne großen Zug auf 20 ml aufgezogen und gründlich mit dem Antikoagulans durchgemischt.

Fehlerquellen:

- kleinlumige Kanülen
- rasches Aufziehen des Venenblutes
- ungenügende Durchmischung
- nicht temperiertes Natriumcitrat
- Verwendung von Glas- statt Polystyrolröhrchen

In allen genannten Fällen kann durch Irritation der Blutplättchen ein fehlerhaftes Meßergebnis entstehen.

3.1.3.2. Inkubation und Zentrifugation

Nach der Blutentnahme wurde in kleinen Küvetten jeweils inkubiert:

- 60 µl MBP mit 1 ml Vollblut
- 30 µl EP und 30 µl NaCl (zum Volumenausgleich) mit 1 ml Vollblut
- 60 µl NaCl mit 1 ml Vollblut

15 Minuten nach Blutentnahme wurden diese Küvetten bei 3000 U/min (entspricht ca. 1500 g) 10 Minuten lang zentrifugiert.

Anschließend wurde das restliche Blut 10 Minuten lang bei 1000 U/min (entspricht ca. 150 g) zentrifugiert,

um plättchenreiches Plasma (PRP) zu gewinnen.

Fehlerquellen: - zu niedrige Raumtemperatur führt zur Irritation der Blutplättchen
- zu große Zentrifugendrehzahl oder zu lange Zentrifugation lassen kein PRP entstehen, weil auch die Plättchen ausgeschleudert werden

3.1.3.3. Aggregationsmessung

35 Minuten nach Blutentnahme startete die Aggregationsmessung. Nacheinander wurden die im folgenden beschriebenen Versuche ausgeführt. Dabei waren folgende Fehlerquellen zu beachten:

- zu geringe Anzahl von Blutplättchen im PRP
- Erythrozyten im PRP
- trübes Plasma infolge einer Fettstoffwechselstörung beim Patienten
- hämolysiertes Plasma

3.2. Versuche

3.2.1. Plättchenreiches Plasma und Serum

In einer Küvette mit Rührmagnet wurde das Verhalten der Blutplättchen von 900 µl PRP eine Minute lang beobachtet. Anschließend wurden 100 µl des hochzentrifugierten Serums zugegeben. Nach einer weiteren Minute wurden 20 µl der ADP-Gebrauchslösung zugesetzt, sofern nicht schon eine irreversible Aggregation zu erkennen war. Weitere 5 Minuten wurde die Aggregationskurve aufgezeichnet. Das wurde mit PRP und allen Seren wiederholt (vgl. Tab. 2: Übersicht über die ausgeführten Messungen).

Drei hochzentrifugierte Seren standen zur Verfügung; die Reihenfolge der Messungen ergab sich aus der folgenden Überlegung: Wenn die Plättchen nach Reizung durch ein Antigen stärker Aggregate bilden, so muß dieser Effekt den aus der Alterung entstehenden deutlich überwiegen. Deshalb wurde beim ersten Mal dem PRP Serum von dem mit EP inkubierten Blut zugesetzt, darauf PRP mit MBP-Serum; zuletzt wurde die Kontrollmessung mit PRP und NaCl-inkubiertem Serum ausgeführt.

3.2.2. Plättchenreiches Plasma und Markscheidenprotein

Bei 5 MS-Patienten und 4 Kontrollpatienten wurde nachgeprüft, ob die gegenüber der Kontrollmessung abweichende Aggregationskurve auch ohne Serumzugabe darzustellen ist. Dazu wurde zu 1 ml PRP nach einer Minute reines MBP gegeben, nach einer weiteren Minute wieder 20 µl ADP. Die Menge des zugegebenen MBP variierte und betrug zuletzt 15 µl, d.h. ein Viertel der im Serumversuch verwandten Menge.

3.2.3. Plättchenreiches Plasma und EP

Bei 7 MS-Patienten und einem Kontrollpatienten wurde die Abweichung zwischen Kontrolle und EP-Serumversuch mit reinem EP nachgemessen. Dazu wurde zu 1 ml PRP nach einer Minute 30 µl reines EP gegeben und nach einer weiteren Minute wie gewohnt 20 µl ADP, falls nicht schon eine deutliche Aggregation sichtbar war.

3.2.4. Plättchenreiches Plasma von gesunden Kontroll-
personen und Serum-EP von MS-Patienten

Von zwei klinisch gesunden Kontrollpersonen wurde PRP gewonnen. Zu diesem Plasma wurde von 7 MS-Kranken Serum von Vollblut gegeben, das mit 30 μ l EP inkubiert worden war.

Das Serum war zum Zeitpunkt des Versuchs einige Minuten bis drei Stunden alt und während dieser Zeit bei Raumtemperatur luftdicht abgeschlossen aufbewahrt. Der Versuch lief ab wie gewöhnlich: Zu 900 μ l PRP wurden 100 μ l Serum-EP gegeben. Nach einer Minute erfolgte die Zugabe von 20 μ l ADP, die Aggregationskurve wurde einige Minuten lang aufgezeichnet.

MS-Patienten (vgl. Tab. 3)	PRP + Serum-EP	PRP + Serum-MBP	PRP + Serum-NaCl	PRP + EP	PRP + MBP	PRP + NaCl	PRP (Gesunder) + Serum-EP (MS)
2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34	+	+	+				
1, 9, 12, 24, 25	+	+	+		+	+	
6, 18, 20, 21 a, 26, 27 a, 30	+		+	+			+
Kontrollpatienten (vgl. Tab. 4)							
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29	+	+	+				
15	+	+	+	+	+	+	
5, 10, 23	+	+	+		+	+	

Tab. 2: Übersicht über die ausgeführten Messungen

3.3. MS-Patienten und Kontrollpersonen

3.3.1. MS-Patienten

Die Untersuchung umfaßt 34 Patienten mit klinisch definitiver Multipler Sklerose (entsprechend Tab. 1). Davon sind 29 Personen weiblichen und 5 männlichen Geschlechts. Das Alter der Patienten lag zwischen 24 und 70 Jahren mit einem deutlichen Schwergewicht zwischen 40 und 60 Jahren.

Der Stand der Krankheit wurde nach folgender Klassifizierung beurteilt

- I: schubförmiger Krankheitsverlauf mit
 nahezu kompletten Remissionen
- II: schubförmiger, progredienter Krankheits-
 verlauf mit unvollständigen Remissionen
- III: chronisch progredienter Krankheitsverlauf
 ohne deutlich abgrenzbare Schübe

ferner danach, ob die Krankheit zum Zeitpunkt der Untersuchung

- a: aktiv oder
- b: inaktiv

war. Obwohl dieser Einschätzung natürlich ein stark subjektives Moment anhaftet, scheint sie hilfreich zu sein bei der Auswertung der Ergebnisse.

3.3.2. Kontrollpatienten

In die Kontrollgruppe wurden 29 Patienten mit neurologischen Krankheiten aufgenommen, bei denen zu vermuten stand bzw. sicher war, daß die weiße Marksubstanz des Nervensystems beteiligt war.

Im einzelnen waren folgende Krankheitsbilder vertreten:

- Hirninfarkt (5 Patienten)
- chronisch aktiver Denervierungsprozeß,
Cauda-Syndrom (3 Patienten)
- rezidivierende Anfallsleiden (3 Patienten)
- Hirnblutung (3 Patienten)
- Polyneuroradikulitis (3 Patienten)
- Polyneuroradikulomyelitis (2 Patienten)
- Akrodystrophie (2 Patienten)
- Meningealcarcinose (1 Patient)
- Hirntumor (1 Patient)
- Hirnquetschung nach Schädeltrauma (1 Patient)
- Sinusvenenthrombose (1 Patient)
- unklare Diagnose (3 Patienten)

Davon waren 18 Frauen und 11 Männer im Alter zwischen 17 und 75 Jahren; die Altersverteilung war etwas gestreuter als bei den MS-Patienten.

3.3.3. Ausschlußkriterien

Folgende Ausschlußkriterien wurden wegen möglicher Beeinflussung des Thrombozytenverhaltens bei MS-Patienten und Kontrollpatienten beachtet:

- Migräne
- aktueller Infekt
- Arteriosklerose höheren Grades
- Schwangerschaft
- Herzinfarkt innerhalb des letzten Jahres
- zusätzliche chronische oder konsumierende Krankheiten (Diabetes mellitus, Malignom etc.)
- Behandlung mit Corticosteroiden oder anderen Immunsuppressiva (Imurek etc.) im letzten 1/2 Jahr
- Einnahme thrombozytenaggregationshemmender Medikamente wenige Tage vorher, insbesondere :

Acetylsalicylsäure und Derivate (bis 14 Tage vorher)
Steroide und nicht-steroidale Antiphlogistika,
niedermolekulare Dextrane (Rheomakrodex o.ä.).

4. ERGEBNISSE

Die Fragestellung lautete: Neigen die Thrombozyten von MS-Kranken eher zur Aggregation als die Thrombozyten von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, wenn die Blutplättchen von beiden Gruppen mit Antigenen behandelt werden. Dazu wurden die Aggregationskurven einzeln ausgewertet. Es wurde der qualitative Unterschied je Patient gemessen zwischen der Aggregationsmessung unter Gabe von Antigenen und der Kontrollmessung bei Zusatz von NaCl.

Um die Auswertung zu verdeutlichen, werden hier einige Kurvenbeispiele gezeigt:

- zu Abb. 4:
- 1) Nach Serum-EP-Zugabe ohne weiteres ADP aggregiert das PRP vollständig ohne Desaggregation
 - 2) Nach Zugabe von Serum-MBP und ADP desaggregiert das PRP deutlich wieder
 - 3) Im Kontrollversuch (Serum-NaCl) folgt auf die Desaggregation eine zweite vollständige Aggregationswelle
 - 4) Im vierten Versuch (PRP und reines MBP) ist die Ähnlichkeit mit der zweiten Kurve deutlich

Die Serum-EP Aggregation ist also sehr deutlich gesteigert gegenüber der Kontrolle, die Serum-MBP-Aggregation ist demgegenüber deutlich vermindert. Dieser Kurventyp trat nur bei Messungen an MS-Kranken auf.

- Zu Abb. 5:
- 1) Bei Zugabe von Serum-EP und ADP aggregierte das PRP vollständig mit einer leichten zwischenzeitlichen Tendenz zur Desaggregation
 - 2) Bei Zugabe von Serum-MBP und ADP folgt auf die Aggregation eine unvollständige Desaggregation
 - 3) Der Kontrollversuch zeigt entsprechend der fortgeschrittenen Alterung der Plättchen eine vollständige Aggregation

Die Aggregation bei Zusatz von Serum-EP ist also nicht gesteigert gegenüber der Kontrollmessung, die Aggregation bei Zusatz von MBP-Serum ist dagegen deutlich vermindert zur Kontrollmessung.

Dieser Kurventyp kam bei MS-Patienten und in der Kontrollgruppe vor.

Zu Abb.6: So kann auch häufig der Kurventyp von klinisch Gesunden aussehen. Die Aggregationskurven mit encephalitogenem Peptid, Markscheidenprotein und Kochsalz weisen untereinander keine deutlichen Unterschiede auf. Diese Kurven waren das Meßergebnis von einem Kontrollpatienten.

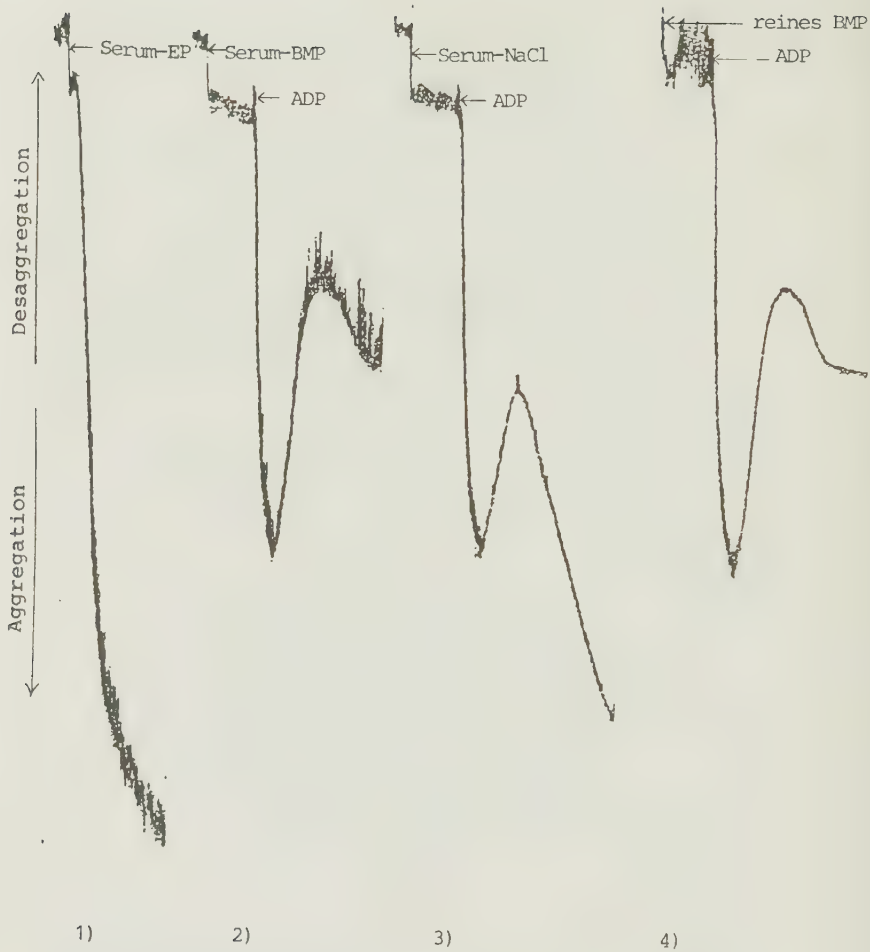


Abb. 4

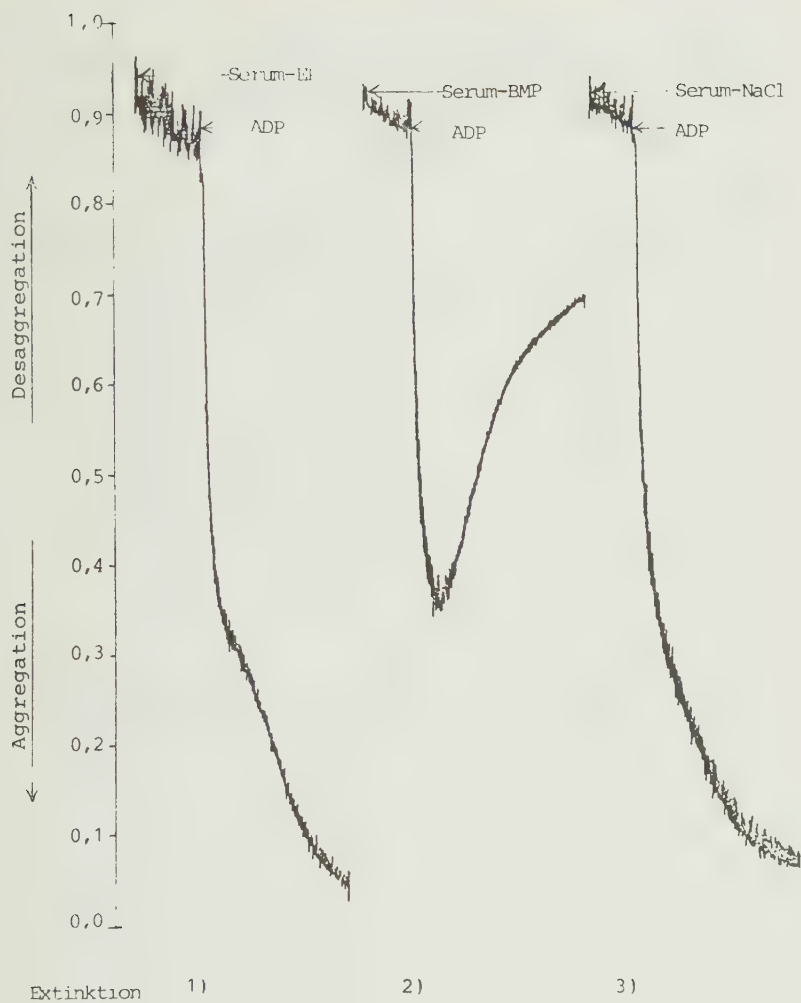
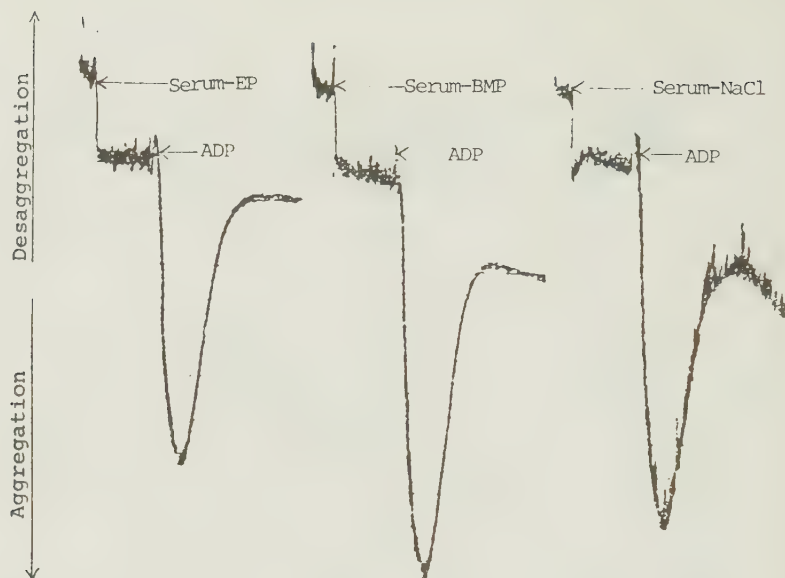


Abb. 5



1) PRP +
Serum-EP

2) PRP +
Serum-BMP

3) PRP +
Serum-NaCl

Abb. 6

Die Ergebnisse der Aggregationsmessungen in den Tabellen 3 und 4 wurden mit folgenden Symbolen bezeichnet:

Serum-EP + ADP $\leq$ NaCl + ADP:	$\emptyset$	normal
Serum-EP + ADP $\nearrow$ NaCl + ADP:	+	leicht gesteigert
Serum-EP ohne ADP $>$ NaCl + ADP:	++	stark gesteigert
Serum-EP ohne ADP $\gg$ NaCl + ADP:	+++	maximal gesteigert
Serum-MBP + ADP $\ll$ NaCl + ADP:	--	stark vermindert
Serum-MBP + ADP $<$ NaCl + ADP:	-	vermindert
Serum-MBP + ADP $=$ NaCl + ADP:	$\emptyset$	normal
Serum-MBP + ADP $>$ NaCl + ADP:	+	leicht gesteigert

In Tabelle 3 sind die Meßergebnisse von sämtlichen
MS-Patienten aufgezeichnet.

Patient Nr.	Alter/Geschlecht	Krankheits- stufe (s.Seite 21)	Ergebnis der Aggre- gationsmessung	
			Serum-EP	Serum-BMP
1	24, weiblich	II a	Ø	Ø
2	30, weiblich	III a	Ø	-
3	31, weiblich	III a	+	Ø
4	32, weiblich	III b	Ø	-
5	35, weiblich	III b	Ø	Ø
6	37, weiblich	III a	+++	nicht gemessen
7	39, weiblich	III a	Ø	-
8	42, weiblich	III a	Ø	--
9	42, weiblich	II a	+	-
10	42, weiblich	II a	Ø	Ø
11	44, männlich	II b	Ø	Ø
12	44, weiblich	II a	+++	--
13	45, männlich	III a	++	+
14	46, weiblich	III a	+++	--
15	47, weiblich	III a	++	--
16	47, weiblich	III a	+	Ø
17	47, weiblich	III a	Ø	Ø
18	48, weiblich	II a	+++	nicht gemessen
19	50, weiblich	II a	Ø	Ø
20	52, weiblich	III a	++	nicht gemessen
21	54, weiblich	III a	++	-
22	56, weiblich	III b	Ø	--
23	57, weiblich	III b	Ø	Ø
24	58, weiblich	III a	+	-
25	59, weiblich	III a	Ø	--
26	59, weiblich	III a	++	nicht gemessen
27	60, weiblich	III b	++	-
28	60, weiblich	III b	Ø	Ø
29	60, männlich	III a	+	-
30	60, weiblich	III a	++	nicht gemessen
31	65, weiblich	III a	Ø	Ø
32	68, weiblich	III a	Ø	--
33	69, weiblich	III b	+	Ø
34	70, männlich	III a	++	-

In Tabelle 4 sind die Meßergebnisse von sämtlichen Kontrollpatienten aufgezeichnet

Patient Nr.	Alter/ Geschlecht	Krankheitsdiagnose	Ergebnis der Aggre- gationsmessung	
			Serum-EP	Serum-BMP
1	17, weiblich	rezid. Anfallsleiden	Ø	Ø
2	19, weiblich	Anfallsleiden	Ø	Ø
3	19, weiblich	Sinusvenenthrombosen	Ø	Ø
4	20, männlich	Polyneuroradikulitis	Ø	Ø
5	21, männlich	Cauda-Syndrom	Ø	--
6	22, männlich	intrakranielle Blutung	Ø	Ø
7	26, männlich	unklar	Ø	Ø
8	27, weiblich	Hirnquetschung nach Schädeltrauma	Ø	Ø
9	38, männlich	Akrodystrophia	Ø	Ø
10	38, weiblich	Meningealkarcinose	Ø	Ø
11	40, weiblich	unklar	Ø	Ø
12	40, männlich	Hirnblutung	Ø	-
13	45, männlich	Cauda-Syndrom	Ø	Ø
14	45, weiblich	Hirnininfarkt	Ø	Ø
15	46, weiblich	Hirnstamminfarkt	Ø	-
16	47, männlich	PRIND	Ø	--
17	47, weiblich	unklar	Ø	Ø
18	47, weiblich	Polyradikulitis	Ø	Ø
19	49, männlich	Hirnininfarkt	Ø	Ø
20	52, weiblich	Hirnblutung	Ø	Ø
21	60, weiblich	Apoplex	Ø	Ø
22	63, weiblich	Plexusbrachialis-Syndrom	Ø	Ø
23	63, weiblich	Hirnstamminfarkt	Ø	--
24	64, weiblich	Akrodystrophie	++	Ø
25	65, weiblich	Polyneuroradikulomyelitis	Ø	Ø
26	67, weiblich	Meningoradikulitis	Ø	Ø
27	68, männlich	chronisch aktiver Dener- vierungsprozeß, Cauda-Syndrom	Ø	Ø
28	68, weiblich	rezid. Anfallsleiden	Ø	Ø
29	75, weiblich	Hirntumor	Ø	Ø

Die weiteren Einzeluntersuchungen neben den Serumversuchen (vgl. Kap. 3.2.) hatten die folgenden Ergebnisse:

Plättchenreiches Plasma und EP

Dieser Versuch wurde durchgeführt, nachdem Zweifel aufgekommen waren, ob das encephalitogene Peptid nur auf dem Weg über die Vollblutinkubation die Thrombozyten beeinflusst. Bei den folgenden Messungen zeigte sich, daß reines EP auch direkt die Thrombozyten des PRP beeinflusst. Dabei konnten die Ergebnisse des Serum-EP-Versuchs qualitativ und quantitativ bestätigt werden. Falls im Serum-EP-Versuch die Aggregation stärker war als bei der Kontrolle, so war dies ebenso bei Zugabe von reinem EP zum plättchenreichen Plasma der Fall.

Plättchenreiches Plasma und Markscheidenprotein

Auch das MBP beeinflusst die Thrombozyten direkt. Wenn der Serum-Versuch und die Messung mit reinem MBP an gleich frischem PRP mit ähnlichen Mengen von MBP ausgeführt wird, erhält man ähnliche Aggregationskurven von beiden Versuchen (vgl. Abb.4, 2) und 4)).

Plättchenreiches Plasma von gesunden Kontrollpersonen und Serum-EP von MS-Patienten

Die Aggregationskurven aus diesem Versuch zeigen deutlich zwei Stadien (vgl. Abb 7). Bei Zugabe beeinflusst das Serum des MS-Kranken zunächst die Plättchen des Gesunden deutlich; es ergibt sich eine erste Aggregationswelle. Diese führte allerdings nie zur vollständigen Plättchenaggregation. Nach dem Rückgang der ersten Aggregationswelle zeigen die Plättchen im 2. Stadium



Abb. 7: Erläuterung im Text

(nach Zugabe von ADP) das normale Verhalten gesunder Thrombozyten unabhängig vom zugegebenen "MS-Serum". Ein Zusammenhang von Ausmaß der ersten Aggregationswelle und Alter des Serums scheint vorhanden zu sein; Serum, das 1 bis 3 Stunden alt war, zeigte eine geringere Reaktion mit den Blutplättchen als wenige Minuten altes Serum.

Statistik

Die Frage, ob die unterschiedliche Aggregationsneigung gegenüber den verschiedenen Antigenen bei MS-Patienten und neurologischen Kontrollpatienten zufällig oder signifikant ist, läßt sich mit Hilfe des Vierfelder-Chi-Quadrat-Testes beantworten.

Die Vierfeldertafel hat folgende Form:

Merkmalspaar II Merkmalspaar I	Ergebnisse positiv gewertet	Komplementär- ereignisse	insgesamt
Erste Stichprobe	a	b	a+b=n ₁
Zweite Stichprobe	c	d	c+d=n ₂
insgesamt	a+c	b+d	n ₁ +n ₂ =n

Die Prüfgröße Chi-Quadrat (χ^2) wird berechnet nach der Formel

$$\chi^2 = \frac{n(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Jedem Wert von χ -Quadrat ist eine Irrtumswahrscheinlichkeit tabellarisch zugeordnet; die Größe von χ^2 gibt also die Signifikanz des Ergebnisses an.

Zunächst wird die Signifikanz des Ergebnisses für das encephalitogene Peptid überprüft. Nach den Tabellen 3 und 4 werden die Ergebnisse übertragen:

Aggregationsneigung Gruppe	gesteigert	nicht gesteigert	insgesamt
MS-Patienten	18	16	34
Kontrollgruppe	1	28	29

Damit ergibt sich ein Wert von Chi-Quadrat von

$$\chi^2 = 19,89 \text{ bei}$$

$$p < 0,001$$

die Irrtumswahrscheinlichkeit für das Ergebnis ist damit kleiner als 0,1 %.

Die Aggregationsneigung der Blutplättchen von MS-Patienten ist also bei Gabe von EP hochsignifikant gesteigert gegenüber Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.

Die Signifikanzprüfung für die Ergebnisse bei Verwendung des basischen Proteins ergibt:

Aggregations- neigung Gruppe	vermindert	nicht ver- mindert	gesamt
MS-Patienten	16	13	29
Kontroll- patienten	5	24	29

Die Prüfgröße erreicht damit einen Wert von

$$\chi^2 = 9,03$$

Dieser Wert ist größer als 6,64, die Grenze für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % bei zweiseitiger Testung.

Die Aggregationsneigung der Blutplättchen von MS-Patienten ist also bei Gabe von MBP signifikant vermindert ($p < 0,01$) gegenüber Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.

Die Einteilung nach Krankheitsstadien der MS ergibt keine deutlichen Ergebnisse, da die Größe der einzelnen Gruppen zu unterschiedlich ist. Die Einteilung nach aktiver bzw. nicht aktiver MS zeigt eine deutliche Korrelation zwischen aktivem Krankheitsstadium und Aggregationssteigerung (vgl. 5. Diskussion).

5. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Blutplättchen auf zwei verschiedene Antigene, das Nonapeptid EP und das basische Markscheidenprotein, eine vom Normalen abweichende Reaktion zeigen. Dazu wurden MS-Patienten aus jedem Krankheitsstadium mit Patienten anderer neurologischer Erkrankungen verglichen. Zwar wäre es wünschenswert, die Multiple Sklerose allein mit anderen primären Entmarkungskrankheiten zu vergleichen. Das begrenzte allerdings die Zahl der Kontrollpatienten sehr stark, da Entmarkungskrankheiten der weißen Nervensubstanz wie subakute sklerosierende Panencephalitis oder parainfektiöse Encephalomyelitis selten sind. Deshalb besteht die Kontrollgruppe aus Patienten, bei denen eine Schädigung der weißen Nervensubstanz wahrscheinlich bis sicher ist.

Zwei wichtige Ergebnisse lassen sich zunächst festhalten:

- a) Encephalitogenes Peptid führt bei MS-Kranken zu einer deutlichen (statistisch hochsignifikanten) Steigerung der Aggregationsneigung der Blutplättchen.
 - b) Basisches Markscheidenprotein führt bei MS-Kranken zu einer deutlichen (statistisch signifikanten) Verminderung der Aggregationsneigung der Blutplättchen.
- Diese Ergebnisse sollen etwas näher beleuchtet werden.

Die Wirkung von EP wurde in einem Versuch über die Vollblutinkubation erprobt. Dem liegt die Vorstellung zugrunde, daß EP mit Blutbestandteilen wie z.B. Lymphozyten reagiert. Diese geben dabei einen (hypothetischen) plättchenwirksamen Faktor ab, der die Aggregationsneigung

fördert. In diesem Versuch wiesen 6 MS-Patienten eine leicht gesteigerte, 8 Patienten eine stark gesteigerte Aggregation auf; bei 4 Patienten reichte die alleinige Zugabe des Serum-EP aus zur Induktion einer vollständigen, irreversiblen Aggregation. Dieser Effekt wurde bisher ausschließlich bei MS-Kranken nachgewiesen. Bei keinem Patienten der Kontrollgruppe gibt es etwas Ähnliches. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in der Arbeit von WIRRWITZ (45) festgestellt.

Der nächste Versuch zeigte allerdings, daß der Weg über die Vollblutinkubation nicht unbedingt notwendig ist. In einem Vergleich wies die direkte Zugabe von EP zu plättchenreichem Plasma qualitativ und auch näherungsweise quantitativ die gleichen Ergebnisse auf wie die Aggregationsinduktion durch Serum-EP. Das bedeutet, daß EP auch direkt auf die Blutplättchen einwirkt. Es stellt sich die Frage, welcher Blutbestandteil für das Verhalten der Thrombozyten von MS-Kranken gegenüber EP verantwortlich ist: die Blutplättchen, ein Faktor im Serum, beides oder weitere, bislang unbekannte Faktoren.

Einen ersten Anhalt gibt dabei der Versuch, bei dem vollblutinkubiertes EP-Serum zu plättchenreichem Plasma von klinisch Gesunden gegeben wurde. Die Aggregationskurve ist zweiphasig, wie im Kapitel 4. beschrieben wurde (vgl. Abb. 7). Eine derartig starke Aggregationsinduktion wie in der ersten Phase durch Serum-EP wurde in dieser Untersuchung nur bei MS-Kranken beobachtet. Die zweite Phase der Kurve zeigt dagegen die typische ADP-induzierte Aggregation bei einem Gesunden und scheint unabhängig vom zugefügten MS-Serum zu sein. Obwohl die Zahl der so untersuchten Proben gering ist, kann man folgende Vermutung aufstellen:

Im Serum MS-Kranker ist ein Faktor, der auch auf die Plättchen Gesunder einen aggregationsfördernden Reiz ausübt. (Das EP allein kann es nicht sein, da EP ohne ADP in keinem solchen Versuch bei Kontrollpersonen oder etwa klinisch Gesunden eine Thrombozytenaggregation induziert.) Der Faktor könnte mit EP Immunkomplexe bilden, die bekanntermaßen Plättchen zur viskösen Metamorphose veranlassen können (1, 30). Dieser Faktor reicht nicht aus, um gesunde Plättchen zur vollständigen Aggregation zu veranlassen und scheint nach einiger Zeit bei Raumtemperatur weniger wirksam zu werden.

BOLTON et al. (4) stellten 1968 fest, daß eine abnorme Reaktion gesunder Plättchen auf ADP durch das Serum MS-Kranker übertragen werden kann. Als verantwortlichen Faktor stellten sie ein Lysolecithin der "low density"-Lipoproteine fest; der Faktor wird unwirksam, wenn das Serum länger als 1 Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt wird.

Der Faktor allein reicht nicht aus zur vollständigen Thrombozytenaggregation. Wenn Serum-EP im plättchenreichen Plasma von MS-Patienten die vollständige Aggregation auslösen kann, scheinen also zusätzlich die Thrombozyten in irgendeiner Weise verändert zu sein.

Ein völlig anderes Verhalten zeigen die Thrombozyten in der Reaktion mit basischem Markscheidenprotein. Wiederum wurde zunächst der Effekt über die Inkubation von MBP im Vollblut gemessen. Bei neun MS-Patienten ergab sich eine leicht verminderte Aggregation gegenüber der Kontrollmessung, bei 7 weiteren eine stark

verminderte Plättchenaggregation. In der Kontrollgruppe wiesen nur 5 Patienten ein ähnliches Verhalten auf. Bei einem Teil der Patienten wurde der Versuch wiederholt mit reinem MBP, das zu PRP der MS-Patienten gegeben wurde. Auch hier zeigte sich - wie im Versuch mit EP -, daß MBP direkt auf die Thrombozyten einwirkt. Qualitativ und näherungsweise quantitativ stimmten die Aggregationskurven aus beiden Versuchen überein (vgl. Abb 4).

Wenn man versucht, das Ausmaß der Thrombozytenaggregation mit dem jeweiligen klinischen Stadium der Multiplen Sklerose zu korrelieren, erhält man die folgenden Ergebnisse:

Nicht nur bei als aktiv erkannter MS, sondern auch bei inaktivem Krankheitsstand findet sich eine erhöhte Aggregationsneigung bei Zugabe von EP. Alle vier Fälle EP-induzierter vollständiger Aggregation ohne ADP-Zugabe sind jedoch als aktiv eingestuft worden. Das Verhältnis von gesteigerter zu nicht gesteigerter Aggregationsneigung beträgt im aktiven Stadium 16:10, im inaktiven Stadium 2:6. Bei inaktivem Krankheitsstand scheint die Thrombozytenreaktion deutlich milder zu sein.

Es bleibt die Frage, was diese Ergebnisse für mögliche Hypothesen der Pathogenese bedeuten können. Das Interesse an Untersuchungen der Thrombozytenaggregation leitet sich ursprünglich von der Entdeckung ab, daß Entmarkungs-herde oft Venolen umfassen und von PUTNAMS "vaskulärer Theorie" (35) der Mikrothromben in kleinen Hirnvenen. Auf der anderen Seite schreibt ADAMS (1), daß es bis heute keinen ausreichenden pathohistologischen Beleg für Thrombosen in Herdvenen gibt. Darüber hinaus gibt es keine Anzeichen für eine höhere Zahl von Thrombosen

(z.B. tiefe Beinvenenthrombosen) überhaupt bei MS-Kranken. Trotz des höheren Risikos (häufig eingeschränkte Bewegungsfähigkeit, Bettlägerigkeit) spricht auch die klinische Erfahrung eher für eine geringere Neigung zu Thrombosen. Die Ergebnisse der Aggregationsmessung mit MBP könnten dafür sprechen, daß u.a. basisches Markscheidenprotein, das im Blut und Liquor MS-Kranker selbst sowie in Fragmenten und Abbauprodukten nachgewiesen wurde (21), die Thrombosehäufigkeit herabsetzt.

Die Reaktion der Thrombozyten ist bei Multiple Sklerose-Patienten eindeutig und krankheitsspezifisch verändert. Ob diese Erscheinung eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der MS hat oder nur eine spezielle Abbildung einer größeren zusammenhängenden Schädigung ist, kann nicht schlüssig beantwortet werden.

MARKUS et al. (27) veröffentlichten 1982 Ergebnisse über Metaboliten der Arachidonsäure, die aus dem Zusammenwirken von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten entstehen auf einem Weg, der nicht durch Acetylsalicylsäure beeinflusst wird. Diese Metabolite, z.B. die sogenannten Leukotriene B₄, können Endothelmembranen beeinflussen und durchlässig machen für Leukozyten.

So wäre es vorstellbar, daß bei entsprechender Disposition auf dem Boden einer allgemeinen evtl. virusbedingten Zellbeeinträchtigung Stoffe ihre Wirkung in Hirnvenolen entfalten, die aus der Wechselwirkung von Thrombozyten und Leukozyten mit kleinen Hirngewebeläsionen entstanden sind.

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann festgehalten werden, daß die Messung der Thrombozytenaggregation nach Gabe von EP ein Hilfsmittel zur Diagnosesicherung der MS darstellen kann.

Ein Befund, daß die EP-induzierte Plättchenaggregation nicht gesteigert ist, spricht nicht unbedingt gegen das Vorhandensein einer MS bei entsprechenden klinischen Daten. Wenn sich jedoch EP-induziert ohne ADP-Zugabe eine Aggregationswelle oder die vollständige, irreversible Aggregation der Blutplättchen ergibt, so spricht dies nach den dargelegten Messungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für die Diagnose "Multiple Sklerose".

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion der Blutplättchen bei Multiple Sklerose-Kranken photometrisch untersucht unter dem Einfluß von basischem Markscheidenprotein (MBP) und encephalitogenem Peptid (EP), das einen Abschnitt des MBP darstellt.

Dazu wurde bei 34 MS-Kranken die Thrombozytenaggregation nach Vollblutinkubation mit EP gemessen gegenüber der Aggregationsneigung im entsprechenden Versuch ohne EP. An 29 MS-Patienten wurde in gleicher Weise die Thrombozytenaggregation unter Gabe von MBP gemessen. Als Kontrollgruppe dienten 29 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, die auf mögliche Schäden an der weißen Nervensubstanz hin ausgewählt waren. In der Kontrollgruppe wurden die gleichen Messungen durchgeführt; die Ausschlusskriterien waren in beiden Gruppen dieselben.

Es zeigte sich, daß die Aggregationsneigung nach Zugabe von EP bei MS-Patienten hochsignifikant gesteigert ist ($p < 0,001$). Nach Zugabe von MBP ist die Thrombozytenaggregation signifikant vermindert ($p < 0,01$). MBP und EP können direkt auf die Thrombozyten einwirken. Ausschließlich bei MS-Kranken führte die alleinige Zugabe von EP zu plättchenreichem Plasma in vielen Fällen zu Aggregationswellen oder zu irreversibler Aggregation. Dieser Effekt könnte zur Diagnosesicherung herangezogen werden.

In weiteren Versuchen wurden Wechselwirkungen zwischen Plasmafaktoren und Thrombozyten untersucht.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ADAMS, C.W.M.: The General Pathology of Multiple Sclerosis: Morphological and Chemical Aspects of the Lesions
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE (Eds.) pgs. 203-240,
1983 Chapman and Hall
- 2) ARNADOTTIR, T. et al.:
Circulating Immune Complexes in Patients with Multiple Sclerosis,
Journal of the Neurological Sciences, 55, 273-283 (1982)
- 3) BERNARD, C.C.A., P.R. CARNEGIE and J.R. MACKAY:
Immunoregulatory Mechanisms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE (Eds.) pgs. 479-512,
1983 Chapman and Hall
- 4) BOLTON, C.H., J.R. HAMPTON and O.T. PHILLISON:
Platelet Behaviour and Plasma Phospholipids in Multiple Sclerosis,
The Lancet, 99-104 (1968)
- 5) BORN, G.V.R., M.J. CROSS:
The Aggregation of Blood Platelets,
J. Physiol. 168, 178 London (1963a)
- 6) BORNSTEIN, M.B.: Antigial and Antineural Factors in Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) and Multiple Sclerosis
in: WOLFRAM, F., G.W. ELLISON, J.G. STEVEN, J.M. ANDREWS (Eds.), Multiple Sclerosis, pgs. 119-120 (1972)
Academic Press, New York

- 7) BREDDIN, K., H. GRUN, H.J. KRZYWANIEK and W.P. SCHREMMER:
Zur Messung der "spontanen" Thrombo-
zytenaggregation, Plättchenaggregations-
test III; Methodik,
Klinische Wochenschrift 53, 81-89 (1975)

- 8) BREDDIN, K., H.J. KRZYWANIEK, J. ZIEMER, H. BAUER and H. GRUN
Enhanced Platelet Aggregation as a risk
Factor for Progress and Complications
of Vascular Disease. New Findings with
a Platelet Aggregation Test on Morpholo-
gic Platelet Changes
in: Platelet Aggregation in the Patho-
genesis of Cerebrovascular Disorders,
AGNOLI, A. and C. FAZIO (Eds.) 44-62,
1977 Springer Verlag

- 9) CASPARY, E.A. and E.J. FIELD:
Serotonin Release from Blood
Platelets in Multiple Sclerosis,
Deutsche Zeitschrift für Nervenheil-
kunde 190, 267-272 (1966)

- 10) CASPARY, E.A., J. PRINEAS, H. MILLER, and E.J. FIELD:
Platelet Adhesiveness in Multiple Sclerosis,
The Lancet II, 1108-1109 (1965)

- 11) COUCH, J.R. and R.S. HASSANEIN:
Platelet Hyperaggregability in
Multiple Sclerosis,
Trans. Am. Neurol. Assoc.
102, 62-64 (1977)

- 12) CRUVEIHIER, J.: Atlas d'anatomie pathologique,
1832-1835, Baillière, Paris (1839)

- 13) DANON, D., Z. JERUSHALMY, A. de VRIES:
Incorporation of Influenza Virus
in Human Blood Platelets
Virology 9, 719-722 (1959)

- 14) FIELD, E.J. and E.A. CASPARY:
Behaviour of Blood Platelets in
Multiple Sclerosis
The Lancet, 876-879 (1964)

- 15) FOG, T.: Vessel Plaque Relation and the Cerebrospinal Fluid and Brain Tissue Changes in Multiple Sclerosis
Acta Neurol. Scand., 40 Suppl. 10, 9-15 (1964)
- 16) FRICK, E. und H. STICKL: Lymphozytentransformation bei Multipler Sklerose: Untersuchungen mit Liquor cerebrospinalis, Immunglobulinen und encephalitogenem Protein
Klinische Wochenschrift 19, 1066-1067 (1968)
- 17) FRICK, E., H. STICKL und K.H. ZINN: Lymphozytentransformation bei Multipler Sklerose
Klinische Wochenschrift 52, 238-245 (1974)
- 18) FRICK, E.: Autoimmunkrankheiten des Nervensystems
Der Internist 20, 496-501 (1979)
- 19) GUL, S., A.D. SMITH, R.H.S. THOMPSON, H.P. WRIGHT and K.J. ZILKHA: Fatty Acid Composition of Phospholipids from Platelets and Erythrocytes in Multiple Sclerosis
J. Neurolog. Neurosurg. Psychiat. 33, 506-510 (1970)
- 20) HALLPIKE, J.F.: Clinical Aspects of Multiple Sclerosis in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE (Eds.) pgs. 129-162
(1983) Chapman and Hall
- 21) HALLPIKE, J.F.: Chemical Pathology of Multiple Sclerosis in MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE (Eds.) pgs. 359-378
(1983) Chapman and Hall
- 22) HARRISON, B.M.: Remyelination in the Central Nervous System in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE (Eds.) pgs. 461-478
(1983) Chapman and Hall

- 23) HASHIM, G.: Myelin Basic Protein - Structure, Function and Antigenic Determinants
Immunolog. Rev. 39, 60-107 (1978)
- 24) KURTZKE, J.F.: Epidemiology of Multiple Sclerosis
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTT
(Eds.) pgs. 47-96
(1983) Chapman and Hall
- 25) LAMPERT, P.W.: Structure of the Demyelinating Process
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTT
(Eds.) pgs. 29-46
(1983) Chapman and Hall
- 26) LEIBOWITZ, S.: The Immunology of Multiple Sclerosis
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTT
(Eds.) pgs. 379-412
(1983) Chapman and Hall
- 27) MARCUS, A.J., M.J. BROEKMAN et al.:
Formation of Leukotrienes and Other
Hydroxy Acids during Platelet-Neutrophil
Interactions in Vitro
Biochemical and Biophysical Research
Communications 109/1, 130-137 (1982)
- 28) MILLAR, J.H.D., J.D. MERRETT and A.M. DALBY:
Platelet Stickiness in Multiple Sclerosis
Neurol. Neurosurg. Psychiat.29,
187-189 (1966)
- 29) MORGENSTERN, E. and H.J. REIMERS:
The Platelet Contacts during Aggregation
Blut 47, 1-10 (1983)
- 30) MÜLLER-ECKHARD, C.:
Clinical Significance of Immune
Complex induced Thrombocytopenias
in: Platelets - A Multidis-
ciplinary Approach, de GAETANO, GARATTINI
(Eds.)
(1978) Raven Press New York

- 31) NEU, I., M. PROSIEGEL, V. PFAFFENRATH:
Platelet Aggregation and Multiple
Sclerosis
Acta Neurol. Scand. 66, 497-504 (1982)
- 32) POECK, K.: Neurologie S. 256-261
 (1977) Springer Verlag
- 33) PREGLER, M.: Spontane Thrombozytenaggregation
 bei Schlaganfällen
 Inauguraldissertation
 Universität München, 1983
- 34) PROSIEGEL, M., I. NEU, V. PFAFFENRATH und M. NAHME:
 Thrombozytenaggregation und Multiple
 Sklerose
 Nervenarzt 53, 227-230 (1982)
- 35) PUTNAM, T.J.: Evidences of Vascular Occlusion in
 Multiple Sclerosis and "Encephalomyelitis"
 Arch. Neurol. Psychiat.
 37, 1298-1321 (1937)
- 36) RAINE, C.S.: Multiple Sclerosis and Chronic
 Relapsing EAE: Comparative Ultra-
 structural Neuropathology
 in: MS, HALLPIKE, ADAMS and TOURTELLOTTE
 (Eds.) pgs. 413-460
 1983 Chapman and Hall
- 37) RINDFLEISCH, E.: Histologisches Detail zur grauen
 Degeneration von Gehirn und Rückenmark
 Virchows Arch. 26, 474 (1863)
- 38) ROMINE, J.S. and J. SALK:
 A Study of Myelin Basic Protein as
 a Therapeutic Probe in Patients with
 Multiple Sclerosis
 in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTTE
 (Eds.) pgs. 621-630
 (1983) Chapman and Hall

- 39) ROSE, A.S., G.W. ELLISON, C.W. MYERS and W.W. TOURTELLOTT: Criteria for Clinical Diagnosis of Multiple Sclerosis
Neurology 26, 20-22 (1976)
- 40) SCHRADER, A.: Multiple Sklerose- Eine rätselhafte Krankheit
Das öffentliche Gesundheitswesen 43, 360-364 (1981)
- 41) SEIDEL, D.: Mehrfach ungesättigte (essentielle) Fettsäuren und ihre Bedeutung in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose
Fortschr. Neurol. Psychiat. 50, 173-189 (1982)
- 42) SRIVASTAVA, K.C., T. FOG and J. CLAUSEN: The Synthesis of Prostaglandins in Platelets from Patients with Multiple Sclerosis
Acta Neurol. Scand. 51, 193-199 (1975)
- 43) SWANK, R.L.: Multiple Sclerosis - A Correlation of its Incidence with Dietary Fat
Am. J. Med. Science 220, 421-430 (1950)
- 44) TER MEULEN, V. and J.R. STEPHENSON: The Possible Role of Viral Infections in Multiple Sclerosis and Other Related Demyelinating Diseases
in: MS, HALLPIKE, ADAMS, TOURTELLOTT (Eds.) pgs. 241-274
(1983) Chapman and Hall
- 45) WIRRWITZ, A.: Thrombozytenaggregation und Multiple Sklerose
Experimentelle Untersuchungen zum Problem des Einflusses von encephalitogenem Peptid auf die Thrombozytenaggregation bei Multipler Sklerose
Inaugural-Dissertation
Universität München, 1983

- 46) WRIGHT, H.P., R.H.S. THOMPSON and S.K.J. ZILKHA:
Platelet Adhesiveness in Multiple
Sclerosis
Lancet II, 1109-1110 (1965)

Herrn Prof. Dr. A. SCHRADER danke ich für die freundliche Überlassung des Themas; weiter danke ich Herrn Dr. Ingo NEU.

Herrn Dr. Mario PROSIEGEL danke ich für seinen Einsatz beim Entstehen dieser Arbeit sowie für viele fruchtbare Gespräche.

Frau BOGNAR danke ich für ihre Hilfe bei den Messungen.

LEBENS LAUF

Name: Werner Bachmann

geboren: 30. März 1956 in Bonn

Vater: Dr. Günter Bachmann, Ministerialdirektor a.D.
Caritasdirektor

Mutter: Helga Bachmann, geb. Blum

Volksschule: 1962 bis 1966, Kath. Grundschule
Ippendorf

Gymnasium: 1966 bis 1974, Städtisches Gymnasium
Bonn-Röttgen
1974 Abitur

Bundeswehr: Juli 1974 bis März 1976, Leutnant d.R.

Universität: SS 1976 bis WS 1980/81
Studium der Physik
an der Ludwig-Maximilians-Universität
in München
12. Mai 1982 Diplom-Physiker

SS 1981 bis WS 1981/82
Studium der Humanmedizin an der
Albrecht-Ludwigs-Universität in Freiburg
seit SS 1982 Fortsetzung dieses Studiums
an der Ludwig-Maximilians-Universität

August 1982 Ärztliche Vorprüfung
März 1984 1. Teil der Ärztlichen Prüfung

voraussichtlich Herbst 1986 Beendigung
des Studiums

Heirat: 21. Mai 1981 standesamtliche Trauung
20. Juni 1981 kirchliche Trauung mit
Dr. Cornelia Tauber-Bachmann, geb. Tauber

